



Ministerio
de Ganadería,
Agricultura y Pesca

Dirección
General de
Servicios Ganaderos

Protocolos de evaluación para medir la
eficacia de bioacaricidas para el control de
Rhipicephalus microplus

Versión 01
Página 1

Protocolos de evaluación para medir la eficacia de bioacaricidas para el control de *Rhipicephalus microplus*

	ELABORADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
CARGO	Encargadas Dpto. Control de Productos Veterinarios y Parasitología	Encargada División de Laboratorios Veterinarios	Dirección DGSG
FIRMA	Dra. Natalia Cardozo Dra. Diana Martínez 	Dra. Alejandra Suanes 	Dr. Marcelo Rodríguez Director General 
FECHA	10/8/2026	10/8/2026	10/8/2026



Índice

1. Objetivos

2. Alcance

3. Responsabilidades

- 3.1 División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE)
 - 3.1.1 Departamento de Control de Productos Veterinarios
 - 3.1.2 Departamento de Parasitología
 - 3.1.3 Del solicitante de la prueba

4. Documentos de referencia

5. Protocolo de evaluación para la eficacia biológica de una vacuna contra *Rhipicephalus microplus*

- 5.1 Objetivo del estudio
- 5.2 Materiales y métodos
 - 5.2.1 Etapa de campo
 - 5.2.2 Origen de los bovinos de prueba
 - 5.2.3 Manejo sanitario
 - 5.2.4 Formación de grupos
 - 5.2.5 Criterios de inclusión
 - 5.2.6 Criterios de exclusión
 - 5.2.7 Criterios de remoción
 - 5.2.8 Inoculación
 - 5.2.9 Curva de anticuerpos
 - 5.2.10 Pesaje
 - 5.2.11 Identificación de los animales
 - 5.2.12 Etapa de confinamiento
 - 5.2.13 Alojamiento
 - 5.2.14 Alimentación
 - 5.2.15 Infestación experimental
 - 5.2.16 Procesamiento de garrapatas
 - 5.2.17 Estudio reproductivo



- 5.2.18 Análisis de resultados
- 5.2.19 Cálculo de la eficacia
- 5.2.20 Equipos y materiales de trabajo

6. Protocolo de evaluación de eficacia a campo de hongos entomopatógenos para el control de *Rhipicephalus microplus*

- 6.1 Objetivo
- 6.2 Diseño general del estudio
- 6.3 Época de realización
- 6.4 Animales de estudio
- 6.5 Conteos previos y asignación de grupos
- 6.6 Aplicación del producto
- 6.7 Evaluación postratamiento
- 6.8 Cálculo de la eficacia
- 6.9 Criterio mínimo de aprobación
- 6.10 Criterios de exclusión durante el ensayo

7. Protocolo de evaluación de eficacia en prueba controlada en potreros del DILAVE

- 7.1 Objetivo
- 7.2 Diseño general del estudio
- 7.3 Época de realización
- 7.4 Animales de estudio
- 7.5 Asignación de animales a los grupos
- 7.6 Infestación artificial
- 7.7 Aplicación del producto
- 7.8 Evaluación postratamiento
- 7.9 Cálculo de eficacia
- 7.10 Criterio mínimo de aprobación
- 7.11 Criterios de exclusión durante el ensayo

8. Anexos

- Anexo I. Criterios del examen clínico.
- Anexo II. Planilla de registro de datos.



Abreviaturas y siglas

Sigla	Significado
DILAVE	División de Laboratorios Veterinarios
DGSG	Dirección General de Servicios Ganaderos
MGAP	Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
WAAVP	<i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i>
<i>R. microplus</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>
CRT	Coeficiente de Reducción de la Repleción
CRO	Coeficiente de Reducción de la Oviposición
CRE	Coeficiente de Reducción de la Eclosión
R.E.	Reproducción Estimada
DVB	Diarrea Viral Bovina
IBR	Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
PI3	Parainfluenza bovina tipo 3

2. Alcance

Este documento aplica a todos los ensayos oficiales realizados por la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) de la Dirección General de Servicios Ganaderos para la evaluación de la eficacia biológica de bioacaricidas y/o bio-pesticidas destinados al control de *Rhipicephalus microplus* en bovinos.

Se define como Bioacaricida a los bio-pesticidas específicamente dirigidos al control de ácaros y garrapatas, utilizando organismos vivos o sus derivados para reducir las poblaciones de estos parásitos.

Asimismo, establece los procedimientos para la evaluación experimental en condiciones de establo y de campo de los productos presentados para su registro o autorización ante la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG), de acuerdo con lo establecido en el Decreto N° 17/026 de 20 de enero de 2026 y la normativa complementaria vigente.



1. Objetivos

1. Establecer los protocolos de evaluación oficiales de la eficacia biológica de bioacaricidas destinados al control de *Rhipicephalus microplus* en bovinos.
2. Proporcionar criterios técnicos estandarizados para el diseño, ejecución, seguimiento y evaluación de ensayos experimentales realizados en condiciones controladas y de campo, garantizando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.
3. Definir los criterios de aceptación e interpretación de los resultados obtenidos durante la evaluación oficial de los productos, asegurando que las decisiones de aprobación se fundamenten en evidencia científica objetiva.
4. Verificar que los productos evaluados demuestren niveles adecuados de eficacia biológica, de acuerdo con la normativa nacional vigente y las recomendaciones técnicas internacionalmente aceptadas, incluyendo las directrices de la WAAVP.
5. Contribuir al proceso de registro y autorización de bioacaricidas destinados al control de *Rhipicephalus microplus*, promoviendo la incorporación de herramientas biológicas eficaces que fortalezcan los programas nacionales de control de la garrapata y favorezcan una producción ganadera sostenible

3. Responsabilidades

3.1 División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE)

3.1.1 Departamento de Control de Productos Veterinarios

Es responsable de:

- a. Recibir y evaluar las solicitudes para la realización de ensayos oficiales de eficacia de bioacaricidas.
- b. Verificar que la documentación presentada por el solicitante cumpla con los requisitos establecidos en la normativa vigente.
- c. Coordinar la planificación y ejecución con el Departamento de Parasitología los ensayos oficiales de eficacia.

 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca Dirección General de Servicios Ganaderos	Protocolos de evaluación para medir la eficacia de bioacaricidas para el control de <i>Rhipicephalus microplus</i>	Versión 01 Página 6
---	---	--------------------------------

- d. Recomendar a la Dirección General de Servicios Ganaderos la aprobación, rechazo o la realización de estudios complementarios cuando corresponda.
- e. Mantener actualizados el procedimiento oficial de evaluación de bioacaricidas

3.1.2 Departamento de Parasitología

Es responsable de:

- a. Mantener y suministrar la cepa de referencia de *Rhipicephalus microplus* utilizada en los desafíos experimentales.
- b. Mantener los registros de las actividades desarrolladas durante el ensayo.
- c. Realizar las evaluaciones parasitológicas previstas en el protocolo.
- d. Procesar las muestras obtenidas durante el ensayo.
- e. Determinar los parámetros biológicos y reproductivos de las garrapatas.
- f. Calcular la eficacia biológica del producto conforme a las metodologías oficiales.
- g. Emitir los resultados analíticos e informe de evaluación de la prueba correspondiente.

3.1.3 Solicitante

Es responsable de:

- a. Presentar la solicitud y toda la documentación técnica y administrativa requerida, de acuerdo con lo establecido en la normativa vigente y en el presente procedimiento.
- b. Proporcionar la información adicional, aclaraciones o documentación complementaria que le sea requerida por la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE), dentro de los plazos establecidos.
- c. Garantizar la veracidad, integridad y actualización de la información y documentación presentada.



d. Contar, previo al inicio de los ensayos, con todas las autorizaciones, permisos o habilitaciones que resulten exigibles por la normativa nacional en materia ambiental, de salud pública o cualquier otra que corresponda según la naturaleza del producto y del ensayo.

e. Comunicar oportunamente cualquier modificación de la información presentada que pueda afectar el desarrollo o la evaluación del ensayo.

f. Facilitar las condiciones necesarias para la correcta ejecución de los ensayos oficiales, cuando ello corresponda, y cumplir con los requerimientos técnicos establecidos por DILAVE durante todo el proceso de evaluación.

4. Normativa y documentos de referencia

1. **Ley N° 3.606**, de 13 de abril de 1910, de Policía Sanitaria Animal.
2. **Decreto N° 160/997**, de 21 de mayo de 1997, por el que se adopta el Marco Regulatorio de Productos Veterinarios y su Reglamentación Complementaria.
3. **Decreto N° 17/026**, de 20 de enero de 2026 por el que se reglamenta la evaluación oficial de productos veterinarios que contengan biopesticidas y bioacaricidas para bovinos
4. Procedimientos de DILAVE aplicables a la ejecución de ensayos oficiales y evaluación de productos veterinarios.
5. Holdsworth PA, Kemp D, Green P., et al. (2006). *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants*.
6. Camargo MG, Nogueira MRS, Marciano AF, et al. (2016). *Metarhizium anisopliae for controlling Rhipicephalus microplus under field conditions*. Veterinary Parasitology, 223:38–42.
7. Barbieri A, Rico IB, Silveira C, et al. (2023). *Field efficacy of Metarhizium anisopliae oil formulations against Rhipicephalus microplus using a cattle spray race*. Ticks and Tick-borne Diseases, 14:102147.
8. Klafke GM, Golo PS, Monteiro CMO, Costa-Júnior LM, Reck J. (2024). *Brazil's battle against Rhipicephalus (Boophilus) microplus: current*



strategies and future directions. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology.

9. Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (edición vigente).

5. Protocolo de evaluación para la eficacia biológica de una vacuna contra la garrapata *Rhipicephalus microplus*.

5.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO:

Evaluar la eficacia global de una vacuna en bovinos desafiados experimentalmente con infestaciones controladas con una cepa de garrapatas *R. microplus* de referencia en Uruguay (Cepa Mozo).

5.2 MATERIALES Y METODOS

5.2.1 Etapa de Campo

5.2.2 Origen de los bovinos de prueba

Los animales provienen de un establecimiento de cría de la DGSG del MGAP ubicado en el Departamento de Tacuarembó el cual es administrado por el Departamento de Recursos Biológicos de la DILAVE "Miguel C. Rubino". En el sistema de cría los animales nunca reciben tratamientos contra ectoparásitos, no tienen contacto previo con garrapatas y son libres de hemoparásitos.

5.2.3 Manejo sanitario

Al comienzo del ensayo los animales serán desparasitados contra nematodos gastrointestinales, se desparasitarán nuevamente a los 21 días después de la primera desparasitación y antes del ingreso a boxes.

Los 12 animales involucrados en el experimento, para su ingreso al mismo deben ser previamente vacunados contra clostridiosis.

5.2.4 Animales de prueba - Formación de grupos



Se seleccionará un grupo de 12 bovinos *Bos taurus*, raza Hereford, con un rango de peso aproximado 180 - 220Kg y una edad entre 12 y 18 meses. El grupo se dividirá en un primer subgrupo compuesto por seis (6) individuos para ser inoculados con el antígeno en desarrollo y el otro grupo con seis (6) animales para el grupo testigo sin vacunación, el cual será inyectado solo con el adyuvante.

5.2.5 Criterios de inclusión

Los bovinos a emplear en el estudio deben cumplir con los siguientes criterios: No presentar, ni haber tenido exposición previa a garrapatas; no evidenciar síntomas de enfermedad al examen clínico; no tener señales de enfermedades congénitas; no haber sido tratados con acaricida químico ni con lactonas macrocíclicas.

Los bovinos deberán ser diagnosticados serológicamente para determinar infecciones inmunosupresoras como Leucosis Bovina, Diarrea Viral Bovina (DVB), Parainfluenza 3 (PI3), Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR).

5.2.6 Criterios de exclusión

Que no cumpla con alguno de los criterios de inclusión mencionados.

5.2.7 Criterios de remoción de un sujeto del estudio

Cualquier animal puede ser eliminado del estudio si se determina que no cumple con los criterios de inclusión, si se encuentra alguna reacción adversa seria, lesión o enfermedad o si se muere espontáneamente. En caso de muerte se realizará necropsia con posterior estudio histopatológico en el Departamento de Histopatología de la DILAVE y posterior cremación en laboratorio o disposición a campo.

En caso de requerir alguna medicación se hará de acuerdo con la patología, siempre y cuando no interfiera directa o indirectamente con el modo de acción de la vacuna.



5.2.8 Inoculación

Durante la etapa de inmunización, los bovinos se mantendrán en el campo experimental de la DILAVE en la localidad de Aguas Blancas, Departamento de Lavalleja. Los mismos se ubicarán en un potrero sobre campo natural con suplemento de fardos de alfalfa y ración balanceada.

La inoculación se realizará según criterio establecido por el laboratorio, número de dosis, intervalo entre dosis, volumen y vía de administración. Se utilizará una jeringa con aguja estéril por cada animal, teniendo precauciones de evitar reflujo desde el punto de inoculación realizando controles posteriores para observar si se desarrollan reacciones locales inflamatorias o infecciosas.

5.2.9 Curva de anticuerpos

Para monitoreo de anticuerpos el laboratorio solicitante de la prueba, realizará la extracción de una muestra de sangre a partir de la vena yugular o coccígea para obtener suero, previo a cada inmunización y cuando así lo requiera. Se utilizará una jeringa con aguja estéril por animal.

5.2.10 Pesaje de los bovinos

Los animales serán controlados en la evolución del peso vivo una vez al mes.

5.2.11 Identificación de los animales

Se identificarán mediante las caravanas de trazabilidad.

5.2.12 Etapa de Confinamiento – Prueba de Establo

Una vez terminada la inmunización a campo, los animales son trasladados a la DILAVE “Miguel C. Rubino” para el desafío experimental con garrapatas.

5.2.13 Alojamiento de los animales:

Los animales ingresarán a boxes individuales para un período de adaptación a las instalaciones y al régimen alimenticio durante 10 días mínimo previos a la primera infestación con *R. microplus*.



Los boxes individuales están fabricados en mampostería, con piso de concreto y un sobrepiso ranurado de madera que permite el paso de las teleoginas que caen de los animales. El piso de material tiene un desnivel adecuado para permitir el lavado del box, con una salida en la cual se puedan recuperar las garrapatas que caen.

5.2.14 Alimentación animal

Los animales son alimentados diariamente en base a ración balanceada de autoconsumo de acuerdo al 3% del peso vivo. Dispondrán de agua *ad libitum*.

5.2.15 Infestación con larvas de garrapatas

Pasados 21 días de la tercera dosis de vacunación y del período de adaptación, se procederá a infestar con 2000 larvas de aproximadamente 21 días de edad de garrapatas *R. microplus* de la cepa Mozo. Para ello se pesarán 100 mg. de larvas las que serán depositadas y distribuidas sobre la zona dorsal o ventral del bovino. Las infestaciones se realizarán 2 veces por semana durante 3 semanas consecutivas.

5.2.16 Procesamiento de las garrapatas colectadas

Las teleoginas que caen serán colectadas diariamente de cada box sobre una malla de acero de 0,5 mm y llevadas al laboratorio donde se contarán y pesarán previo lavado y secado.

Posteriormente se seleccionará al azar una alícuota de 20 garrapatas por box, se colocarán en cajas de Petri plásticas de 9 cm, se pesará la base de la caja y las garrapatas, luego se pondrán a ovipositar en condiciones óptimas de temperatura (27°C), humedad (90%) y fotoperiodo (12:12; luz: oscuridad).

5.2.17 Estudio reproductivo de las garrapatas

A los 14 días posteriores a la caída de las garrapatas, se pesarán los huevos y se eliminarán las garrapatas xenoginas.

Los huevos se mantienen en las mismas condiciones de incubación durante 25 días más para calcular la eclosión. La misma se realiza de forma directa



determinando visualmente la relación: huevos eclosionados/huevos no eclosionados *100. Se dispondrá de una lupa estereoscópica de apoyo visual.

5.2.18 Análisis de los resultados

Para el cálculo de eficacia se aplicarán las siguientes fórmulas analizadas estadísticamente:

5.2.19 Cálculo de la eficacia

Se empleará la fórmula que permita estimar diferencias porcentuales entre Hembras Caídas en el grupo control y en el vacunado.

- Porcentaje de Control de Hembras Caídas

$$[(\text{Hembras Caídas en Control} - \text{Hembras Caídas en Vacunados}) / (\text{Hembras Caídas en Control})] * 100$$

- Reproducción Estimada (R.E.)

$$\text{R.E.} = (\text{Peso de Huevos} / \text{Peso de hembras incubadas}) * \% \text{Eclosión} * 20.000$$

Fórmula general de Porcentaje de Eficacia:

$$\% \text{Eficacia} = 100 (1 - \text{CRT} * \text{CRO} * \text{CRE}) \text{ donde,}$$

- Coeficiente de reducción de la repleción (CRT)

$$\text{CRT} = \frac{\text{Peso promedio de las teleoginas en el grupo vacunado}}{\text{Peso promedio de las teleoginas en el grupo control}}$$

Peso promedio de las teleoginas en el grupo control

- Coeficiente de reducción de la ovoposición (CRO)

$$\text{CRO} = \frac{\text{Peso promedio del aove de las teleoginas en el grupo vacunado}}{\text{Peso promedio del aove de las teleoginas en el grupo control}}$$

Peso promedio del aove de las teleoginas en el grupo control



- Coeficiente de reducción de la eclosión (CRE)

CRE = Porcentaje de eclosión del aove en el grupo vacunado

Porcentaje de eclosión del aove en el grupo control

5.2.20 Equipos y materiales de trabajo

- Balanza para pesar los animales.
- Balanza analítica para el pesaje de las garrapatas.
- Cuarto o estufa con humedad controlada (27 grados centígrados y más de 90% de humedad) para poner a ovipositar las garrapatas y eclosionar los huevos.
- Centrífuga para separar sueros
- Micropipetas para manipulación de suero
- Lupa Estereoscópica
- Coladores para recolección de teleoginas
- Cajas Petri, algodón, gasa y cinta de enmascarar para identificación.
- Elementos para el trabajo en boxes: mangueras, cepillos, escobas, baldes, palas, overoles, botas de goma.
- Toallas de papel, termómetros clínicos, guantes de nitrilo o látex.

6 Protocolo de evaluación de eficacia a campo de hongos entomopatógenos para el control de *Rhipicephalus microplus*

6.1 Objetivo

Evaluar la eficacia a campo de productos formulados en base a hongos entomopatógenos para el control de *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) en



bovinos naturalmente infestados, bajo condiciones ambientales compatibles con las recomendaciones de uso del fabricante.

6.2 Diseño general del estudio

El ensayo se realizará bajo condiciones de campo, en bovinos naturalmente infestados con *R. microplus*. El producto será aplicado una única vez, en el día 0, siguiendo estrictamente las condiciones de uso indicadas por el fabricante, incluyendo dosis, volumen de aplicación, método de aplicación, temperatura, humedad relativa, horario recomendado y restricciones asociadas a la lluvia o a la radiación solar.

El estudio incluirá dos grupos experimentales: un grupo tratado con el producto evaluado y un grupo control sin tratamiento.

6.3 Época de realización

El ensayo deberá realizarse durante el período de mayor actividad natural de *R. microplus* en Uruguay, evitando los meses de invierno o períodos de baja infestación natural. La realización del estudio fuera del período de desafío parasitario suficiente podría sobreestimar la eficacia del producto.

Se deberán considerar las indicaciones del fabricante respecto a las condiciones ambientales de uso del producto. Cuando el fabricante establezca rangos o condiciones específicas para la aplicación, el ensayo deberá realizarse dentro de dichos parámetros. En ausencia de especificaciones, el ensayo se realizará bajo condiciones ambientales desfavorables para la supervivencia y actividad del hongo entomopatógeno, pero compatibles con el desarrollo normal de la infestación por *R. microplus*.

6.4 Animales de estudio

Se utilizarán un total de 30 bovinos naturalmente infestados con *R. microplus*. Los animales deberán pertenecer a la misma raza o biotipo, tener más de 12 meses de edad, con un rango de peso 180 - 220Kg y una edad entre 12 y 18 meses y encontrarse bajo condiciones de manejo sanitario y nutricional similares.



No podrán incluirse animales que hayan recibido tratamientos acaricidas químicos durante los 60 días previos al inicio del ensayo, o durante un período mayor cuando el producto utilizado previamente presente acción residual prolongada.

Los animales deberán presentar una infestación mínima de 20 de *R. microplus* de entre 4,5 y 8 mm, contadas en un lado del animal, en el conteo basal previo a la asignación a los grupos experimentales.

Durante todo el período experimental, los animales de cada grupo deberán permanecer separados en potreros diferentes y mantenerse bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación y disponibilidad de agua.

No se incluirán animales enfermos, debilitados, con lesiones cutáneas extensas, ni aquellos que, por su condición corporal, temperamento o estado sanitario puedan interferir con la correcta aplicación del producto o con la evaluación de la carga parasitaria.

6.5 Conteos previos y asignación de animales

Previo al tratamiento se realizarán conteos de garrapatas los días -14, -7, -3 y 0. Los conteos se realizarán sobre un lado del bovino, registrando únicamente garrapatas de *R. microplus* de entre 4,5 y 8 mm.

La asignación de animales a los grupos se realizará en función a la carga parasitaria inicial. Para ello, los animales serán ordenados de mayor a menor según el número de garrapatas registrado en el conteo basal del día -3. Luego se formarán bloques de dos animales. Dentro de cada bloque, los animales serán asignados aleatoriamente a los grupos experimentales, resultando en 15 animales por grupo.

Este procedimiento permitirá que los grupos inicien el ensayo con cargas parasitarias comparables y reducirá el efecto de la variabilidad individual en susceptibilidad a la infestación por garrapatas.

 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca Dirección General de Servicios Ganaderos	Protocolos de evaluación para medir la eficacia de bioacaricidas para el control de <i>Rhipicephalus microplus</i>	Versión 01 Página 16
---	---	---------------------------------

6.6 Aplicación del producto

El producto se aplicará una única vez en el día 0. La aplicación deberá realizarse siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Se deberá registrar:

- a. nombre comercial del producto.
- b. composición declarada.
- c. concentración del hongo o de los hongos incluidos.
- d. lote y fecha de vencimiento.
- e. dosis utilizada.
- f. condiciones ambientales recomendadas por el fabricante para la aplicación.
- g. volumen aplicado por animal.
- h. método de aplicación.
- i. temperatura y humedad relativa al momento de la aplicación.
- j. horario de aplicación.
- k. presencia o ausencia de lluvia antes y después del tratamiento.
- l. observaciones sobre el mojado completo del animal.

6.7 Evaluación postratamiento

Luego de la aplicación se realizarán conteos de garrapatas los días +3, +7, +14, +21, +28 y +35 para evaluar la persistencia del efecto.

En cada conteo se registrará el número de garrapatas de *R. microplus* de entre 4,5 y 8 mm presentes en un lado del animal. Los conteos deberán ser realizados por personal previamente capacitado para la identificación y



cuantificación de garrapatas. Los conteos deberán realizarse primero en el grupo control y posteriormente en el grupo tratado, con el fin de minimizar el riesgo de transferencia accidental del producto entre grupos.

6.8 Cálculo de eficacia

La eficacia del producto se calculará para cada fecha de evaluación comparando la evolución de la carga parasitaria del grupo tratado respecto al grupo control, utilizando una fórmula corregida por las diferencias basales entre grupos, de acuerdo con los criterios utilizados en estudios de eficacia de ectoparasiticidas y recomendaciones WAAVP.

La eficacia semanal podrá calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia (\%)} = [1 - (Tb \times Ca) / (Ta \times Cb)] \times 100$$

donde:

Tb = promedio de número de garrapatas en el grupo tratado en la semana evaluada;

Ca = promedio de número de garrapatas en el grupo control antes del tratamiento;

Ta = promedio de número de garrapatas en el grupo tratado antes del tratamiento;

Cb = promedio de número de garrapatas en el grupo control en la semana evaluada.

6.9 Criterio mínimo de aprobación

El producto será considerado eficaz si alcanza una eficacia igual o superior a 60% bajo condiciones de campo, calculada a partir del promedio de los recuentos realizados entre los días +14 y +28 postratamiento. Cuando la formulación evaluada establezca expresamente un período de acción diferente, este podrá ser considerado para la interpretación de los resultados.

 Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca Dirección General de Servicios Ganaderos	Protocolos de evaluación para medir la eficacia de bioacaricidas para el control de <i>Rhipicephalus microplus</i>	Versión 01 Página 18
---	---	---------------------------------

6.10 Criterios de exclusión durante el ensayo

Los animales que reciban tratamientos antiparasitarios no previstos en el protocolo, presenten enfermedades que puedan modificar la carga parasitaria, o no completen todas las evaluaciones establecidas, serán excluidos del análisis final.

Bibliografía

- Holdsworth PA, Kemp D, Green P, et al. 2006. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants.
- Camargo MG, Nogueira MRS, Marciano AF, et al. 2016. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 223:38–42.
- Barbieri A, Rico IB, Silveira C, et al. 2023. Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14:102147.
- Klafke GM, Golo PS, Monteiro CMO, Costa-Júnior LM, Reck J. 2024. Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: current strategies and future directions. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 33(2):e001423.

7. Protocolo de evaluación de eficacia en prueba controlada en potreros del DILAVE de hongos entomopatógenos para el control de *Rhipicephalus microplus*.

7.1 Objetivo

Evaluar la eficacia en prueba controlada de productos formulados en base a hongos entomopatógenos para el control de *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) en bovinos infestados artificialmente en DILAVE, bajo condiciones compatibles con las recomendaciones de uso del fabricante.



7.2 Diseño general del estudio

El ensayo se realizará en bovinos mantenidos en condiciones controladas de establo o potreros separados, con infestación artificial por *R. microplus*. El producto será aplicado una única vez, en el día 0, siguiendo estrictamente las condiciones de uso indicadas por el fabricante, incluyendo dosis, volumen de aplicación, método de aplicación, temperatura, humedad relativa, horario recomendado y restricciones asociadas a la lluvia o a la radiación solar.

El estudio incluirá dos grupos experimentales: un grupo tratado con el producto evaluado y un grupo control sin tratamiento.

7.3 Época de realización

Se deberán considerar las indicaciones del fabricante respecto a las condiciones ambientales de uso del producto. Cuando el fabricante establezca rangos o condiciones específicas para la aplicación, el ensayo deberá realizarse dentro de dichos parámetros. En ausencia de especificaciones, el ensayo se realizará bajo condiciones ambientales desfavorables para la supervivencia y actividad del hongo entomopatógeno, pero compatibles con el desarrollo normal de la infestación por *R. microplus*.

7.4 Animales de estudio

Se utilizarán un total de 20 bovinos artificialmente infestados con *R. microplus*. Los animales deberán pertenecer a la misma raza o biotipo, tener un rango de peso 180 - 220Kg y una edad entre 12 y 18 meses y encontrarse bajo condiciones de manejo sanitario y nutricional similares.

No podrán incluirse animales que hayan recibido tratamientos acaricidas químicos durante los 60 días previos al inicio del ensayo, o durante un período mayor cuando el producto utilizado previamente presente acción residual prolongada.

Durante todo el período experimental, los animales de cada grupo deberán permanecer separados en potreros diferentes y mantenerse bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación y disponibilidad de agua.



No se incluirán animales enfermos, debilitados, con lesiones cutáneas extensas, ni aquellos que, por su condición corporal, temperamento o estado sanitario puedan interferir con la correcta aplicación del producto o con la evaluación de la carga parasitaria.

7.5 Asignación de animales a los grupos

La asignación de los animales a los grupos experimentales se realizará mediante pareo por peso corporal. Para ello, los bovinos serán ordenados de mayor a menor peso y se formarán pares de animales con pesos similares. Dentro de cada par, los animales serán asignados aleatoriamente al grupo tratado o al grupo control, resultando en 10 animales por grupo.

Este procedimiento permitirá que ambos grupos inicien el ensayo con características corporales comparables, reduciendo el efecto de la variabilidad individual sobre la respuesta a la infestación artificial y al tratamiento.

7.6 Infestación artificial

Los animales serán infestados artificialmente con larvas viables de *R. microplus* durante un período previo al tratamiento. La infestación se realizará dos veces por semana por 3 semanas, previos al día de inicio del tratamiento, utilizando 2000 larvas por animal en cada infestación.

7.7 Aplicación del producto

El producto se aplicará una única vez en el día 0. La aplicación deberá realizarse siguiendo estrictamente las indicaciones del fabricante. Se deberá registrar:

- a. nombre comercial del producto
- b. composición declarada
- c. concentración del hongo o de los hongos incluidos.
- d. lote y fecha de vencimiento.



- e. dosis utilizada.
- f. condiciones ambientales recomendadas por el fabricante para la aplicación.
- g. volumen aplicado por animal.
- h. método de aplicación.
- i. temperatura y humedad relativa al momento de la aplicación.
- j. horario de aplicación.
- k. presencia o ausencia de lluvia antes y después del tratamiento.
- l. observaciones sobre el mojado completo del animal.

7.8 Evaluación pos tratamiento.

Luego de la aplicación se realizarán conteos de garrapatas los días +3, +7, +14, +21, +28 y +35 para evaluar la persistencia del efecto.

En cada conteo se registrará el número de garrapatas de *R. microplus* de entre 4,5 y 8 mm presentes en un lado del animal. Los conteos deberán ser realizados por personal previamente capacitado para la identificación y cuantificación de garrapatas. Los conteos deberán realizarse primero en el grupo control y posteriormente en el grupo tratado, con el fin de minimizar el riesgo de transferencia accidental del producto entre grupos.

7.9 Cálculo de eficacia

La eficacia del producto se calculará para cada fecha de evaluación comparando la evolución de la carga parasitaria del grupo tratado respecto al grupo control, utilizando una fórmula corregida por las diferencias basales entre grupos, de acuerdo con los criterios utilizados en estudios de eficacia de ectoparasiticidas y recomendaciones WAAVP.



La eficacia semanal podrá calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia (\%)} = [1 - (Tb \times Ca) / (Ta \times Cb)] \times 100$$

donde:

Tb = promedio de número de garrapatas en el grupo tratado en la semana evaluada;

Ca = promedio de número de garrapatas en el grupo control antes del tratamiento;

Ta = promedio de número de garrapatas en el grupo tratado antes del tratamiento;

Cb = promedio de número de garrapatas en el grupo control en la semana evaluada.

7.10 Criterio mínimo de aprobación

El producto será considerado eficaz si alcanza una eficacia igual o superior a 60% en condiciones de establo, calculada a partir del promedio de los recuentos realizados entre los días +14 y +28 postratamiento. Cuando la formulación evaluada establezca expresamente un período de acción diferente, este podrá ser considerado para la interpretación de los resultados.

7.11 Criterios de exclusión durante el ensayo.

Los animales que reciban tratamientos antiparasitarios no previstos en el protocolo, presenten enfermedades que puedan modificar la carga parasitaria, o no completen todas las evaluaciones establecidas, serán excluidos del análisis final.

Bibliografía

- Holdsworth PA, Kemp D, Green P, et al. 2006. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for



evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants.

- Camargo MG, Nogueira MRS, Marciano AF, et al. 2016. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 223:38–42.
- Barbieri A, Rico IB, Silveira C, et al. 2023. Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14:102147.
- Klafke GM, Golo PS, Monteiro CMO, Costa-Júnior LM, Reck J. 2024. Brazil's battle against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks: current strategies and future directions. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 33(2): e001423

8. Anexos. - Anexo I Criterios del Examen Clínico

En caso de presentarse un caso clínico se deberá realizar el siguiente examen clínico además de los estudios colaterales disponibles para tratar de llegar a un diagnóstico definitivo.

1. Ocular: (opacidad de la córnea, nistagmos, cambios pupilares, blefaroespasmos, ceguera, examen de ojo, iritis, equimosis, fotofobia, congestión episcleral, conjuntivitis, descarga o lagrimeo).
2. Equilibrio: (inestabilidad en piernas delanteras, inestabilidad en piernas traseras, inestabilidad de pie, inestabilidad mientras camina, incoordinación de piernas delanteras, incoordinación de piernas traseras, ataxia anterior o paresis, ataxia posterior o paresis, reflejos anormales).



3. **Apetito:** salud general (peso corporal, consumo del alimento/tiempo, consumo del agua/tiempo, condición corporal, hidratación).
4. **Problemas musculares** (temblores de tríceps, temblores de piernas delanteras, temblores de piernas traseras, temblores generalizados, labio caído y/o salivación, parálisis atonía, atrofia).
5. **Tegumentario** (alopecia, condiciones de pelaje, estado de hidratación, prurito, sensibilidad al tocar, eritema cutáneo, estado de la nariz, oídos, cojinetes).
6. **Gastrointestinal** (consistencia de heces, diarrea, cólico, músculos abdominales tensos, transpiración, auscultación, color de las heces).
7. **Respiratorio** (respiración/minuto, disnea, sonidos respiratorios, descarga nasal, apnea, polipnea).
8. **Conducta** (ansiedad, aprehensivo, camina en círculos, deprimido, recumbencia dorso-ventral, recumbencia lateral, inquieto, nariz o labio arrugado, cabeza temblorosa).
9. **Cavidad Oral** (dolor, inflamación, necrosis).
10. **Temperatura Corporal.**